Journal of Agroecology
Homepage: https://agry.um.ac.ir/

Research Article
Vol. 14, No. 3, Fall 2022, p. 531-548

The Effect of Mycorrhizal Fungus, Humic Acid, and Vermicompost on Biochemical and Yield Properties of *Silybum marianum*

F. Nikkhah Naeeni[1], A. Ladan Moghadam[2*], P. Moradi[3], V. Abdoosi[4] and M. Rezaei[5]

Received: 10-03-2021
Revised: 11-06-2021
Accepted: 12-06-2021
Available Online: 13-12-2022

How to cite this article:
Nikkhah Naeeni, F., Ladan Moghadam, A., Moradi, P., Abdoosi, V., and Rezaei, M., 2022. The effect of mycorrhizal fungus, humic acid, and vermicompost on biochemical and yield properties of *Silybum marianum*. Journal of Agroecology 14(3): 531-548.
DOI: 10.22067/agry.2021.68348.1012

Introduction

Milk thistle (*Silybum marianum)* is one of the most popular medicinal plants in most developed countries. In the past, milk thistle leaves have been used to treat biliary and gastrointestinal diseases. It has valuable effects on the prevention and treatment of long-term complications of diabetes, renal failure, and nerve cell disorders. Silibinin is the most important flavonoid in the plant that plays an important role in prostate cancer treatment. Humic Materials are part of the organic matter of humus soils resulting from the physical, chemical, and microbiological deformation or homophication of biomolecules in the soil. This study aims at investigating the effect of organic and biological fertilizers including humic acid, vermicompost, and two species of mycorrhizal fungi on the physiological and morphological traits of *Silybum marianum*.

Materials and Methods

This study was conducted in the spring in Gorgan. This study was conducted as factorial experiments using a Completely Randomized Design (CRD). Treatments included four levels of vermicompost (0, 25, 50, and 75%), four levels of humic acid fertilizer (0, 25, 50, and 75 mg.l^{-1}), and two species of mycorrhizal fungi (*Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*). Yield, 1000 - grain weight, leaf area, capitule number, chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, carotenoids, soluble sugars, and protein were measured in the plant. All measurements were carried out in three replications, and mean comparisons were made through the Duncan test ($P<0.05$) using an SPSS-22 software package.

Results and Discussion

The results of the data analysis of variance showed that all the studied properties are affected by the interaction of the applied treatments. The highest *Silybum marianum* yield was obtained in *Glomus mosseae* third level vermicompost and first humic acid level equal to 2296 kg.ha^{-1}. Also, the lowest grain yield was obtained in the control treatment (435 kg.ha^{-1}). The reason for the increase in yield can be attributed to the supply of nutrients, water supply, and improving the respiratory status of the plant due to the use of organic and biological fertilizers. Also, the

1- Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Garmsar, Iran
3-Associate Professor, Department of Horticultural Science, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran
4-Associate Professor, Department of Horticultural Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
5-Associate Professor, Department of Horticultural Science, Agriculture Faculty, Shahrood University of technology, Iran
[*]Corresponding author: LMAR13201396@gmail.com

presence of mycorrhiza fungi and vermicompost has improved the physical condition of the soil and increased the ability of the plant to use soil water. The highest leaf area (3.96 cm^2) was observed in the fourth level of humic acid (75 mg / L) and vermicompost (75%) in both types of *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*. The highest amount of total chlorophyll in the plant (15.26 mg / g fresh weight) was related to humic acid 50 g / l + mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* at 25% vermicompost level. Mycorrhizal fungus improves nitrogen uptake, which plays a key role in plant chlorophyll structure. On the other hand, nitrogen is the most important element in protein synthesis, which is in favorable condition with the increase of mycorrhizal fungus and leads to an increase in the amount of protein and soluble sugar. The results have shown that the use of humic acid has positive effects on the studied plant characteristics. The highest protein (3.65 mg / wet weight) was obtained in the third level of humic acid and *Glomus intraradices* and the lowest protein (0.92 mg /wet weight) in the control treatment.

Conclusion

The use of organic compounds as fertilizer improves the physical, chemical, and biological properties of soil. Also increases plant growth by providing the plant with the necessary elements. In general, the results showed that the use of organic and bio-fertilizers can improve the status of *Silybum marianum* and these compounds can reduce the use of chemical fertilizers to prevent the adverse effects of these fertilizers on human health and the environment.

Keywords: Bio-fertilizers, Capitule, Carotenoids, Milk thistle, Mycorrhizal.

نشریه بوم شناسی کشاورزی
Homepage: https://agry.um.ac.ir/

مقاله پژوهشی

بررسی اثر قارچ مایکوریزا، ورمی‌کمپوست و هیومیک اسید بر ویژگی‌های بیوشیمیایی و عملکردی گیاه ماریتیغال (*Silybum marianum*)

فروزان نیک‌خواه نایینی[1]، **علیرضا لادن مقدم**[2]*، **پژمان مرادی**[3]، وحید عبدوسی[4] و مهدی رضایی[5]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۰
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۳/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۲۲

نیک‌خواه نایینی، ف.، لادن مقدم، ع.، و مرادی، پ.، ۱۴۰۱. بررسی اثر قارچ مایکوریزا، ورمی‌کمپوست و هیومیک اسید بر ویژگی‌های بیوشیمیایی و عملکردی گیاه ماریتیغال (*Silybum marianum*). بوم‌شناسی کشاورزی ۱۴(۳): ۵۴۸-۵۳۱.

چکیده

ماریتیغال (*Silybum marianum*) از گیاهان دارویی مطرح در زراعت اکثر کشورهای توسعه یافته است. این پژوهش به بررسی تأثیر کودهای آلی و زیستی که شامل هیومیک اسید، ورمی‌کمپوست و دو گونه قارچ مایکوریزا بر صفات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی گیاه ماریتیغال پرداخته است. این پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۸ در شهر گرگان اجرا شد. تیمارهای این آزمایش شامل چهار سطح کود ورمی‌کمپوست (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد)، چهار سطح کود هیومیک اسید (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر) و دو گونه قارچ مایکوریزا (*Glomus mosseae* و *Glomus intraradices*) است. صفات عملکرد، وزن هزاردانه، سطح برگ، تعداد کاپیتول، کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کارتنوئید، قند محلول و پروتئین در گیاه اندازه‌گیری شد. بیشترین عملکرد ماریتیغال با کاربرد قارچ *Glomus mosseae*، ۵۰ درصد ورمی‌کمپوست و بدون مصرف هیومیک اسید برابر با ۲۲۹۶ کیلوگرم در هکتار به‌دست آمد. نتایج نشان داد که استفاده از هیومیک اسید دارای اثرات مثبت بر روی تمام ویژگی‌های گیاه مورد مطالعه است. بیشترین مقدار پروتئین (۳/۶۵ میلی‌گرم در وزن تر) در تیمار مربوط به سطح سوم هیومیک اسید و قارچ *Glomus intraradices* و کمترین پروتئین (۰/۹۲ میلی‌گرم در وزن تر) در شاهد به‌دست آمد. به‌طور کلی، نتایج نشان داد که استفاده از کودهای آلی و زیستی می‌تواند سبب بهبود وضعیت گیاه ماریتیغال شود و با استفاده از این ترکیبات می‌توان مصرف کودهای شیمیایی را کاهش داد تا از اثرات نامطلوب این کودها بر سلامت انسان و محیط زیست جلوگیری شود.

واژه‌های کلیدی: خارمریم، کاپیتول، کاروتنوئید،کلروفیل a

مقدمه

گیاهان دارویی، گیاهانی هستند که بعضی از اندام‌های آن‌ها دارای خواص دارویی است. این گیاهان، از نظر پیشگیری بیماری و درمان و هم در تأمین بهداشت و سلامت جامعه اهمیت دارند.

۱- استادیار، گروه علوم باغبانی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲- استادیار، گروه علوم باغبانی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، ایران.
۳- دانشیار، گروه علوم باغبانی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.
۴- دانشیار، گروه علوم باغبانی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۵- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: LMAR13201396@gmail.com)
DOI: 10.22067/agry.2021.68348.1012

ماریتیغال یا خار (Fayyaz et al., 2011; Valková et al., 2021) مریم (نام علمی *Silybum marianum* از خانواده Asteraceae) (Ram, 2005; Qavami et al., 2013; Valková et al., 2021) از قرن یکم میلادی به بعد در اروپا به‌عنوان دارو مورد استفاده قرار می‌گرفته است. مهم‌ترین ویژگی این گیاه وجود نوارهای سفید رنگ در متن سبز برگ‌ها و حتی ساقه‌ها است که به این گیاه حالت نواری می‌بخشد، همچنین چند بخش شانه‌ای به‌صورت بخش‌های تخم-مرغی مثلثی دارد (Omid Beigi, 1997; Zargari, 1996). گل آن صورتی- ارغوانی رنگ، مژک‌دار و خاردار است که هر یک منتهی به یک زایده وسیع و سرنیزه‌ای می‌باشد و در بخش پایینی خاردار و شانه‌ای و گسترده برگشته است (Omid Beigi, 1998). منشأ این گیاه نواحی شرقی مدیترانه گزارش شده است و فراوان‌ترین منطقه رشد این گیاه، سواحل جنوب شرقی انگلیس (که فراوان‌ترین نقطه کره زمین، این منطقه است)، ایران، آمریکای شمالی و استرالیا و نیوزیلند می‌باشد. مزارع ساخته شده توسط انسان این گیاه، برای مصارف دارویی و برآورد مواد اولیه صنعتی از این گیاه در مناطق وسیعی در اتریش (منطقه والدویرتل)، آلمان، مجارستان، لهستان، چین و آرژانتین قرار داشته و در مناطق اروپایی کاشت این گیاه، هر ساله در بین ماه‌های مارس تا آوریل انجام و برداشت آن در ماه آگوست می-باشد (Greenlee et al., 2007).

برگ‌های ماریتیغال در گذشته برای مداوای بیماری‌های صفراوی و بیماری‌های مربوط به دستگاه گوارشی استفاده می‌شد (Benda et al., 1980). الدر، نویسنده رومی قرن اول بعد از میلاد می‌نویسد گیاه ماریتیغال برای ترشح و انتقال صفرا مفید است. تاریخ درمانی این گیاه به ۲۰۰۰ سال پیش بر می‌گردد و در منابع یونانی از آن به‌عنوان یک داروی محافظت‌کننده کبدی نام برده‌اند؛ کول پیر، اولین گیاه‌شناس دارویی در انگلستان، این گیاه را برای دفع انسداد کبد و طحال و درمان زردی مفید می‌داند (Lupers et al., 1998). از قرن نوزدهم و اوایل قرن بیستم از دانه این گیاه برای درمان وریدهای واریسی ناشی از احتقان کبد و طحال، التهاب لوزالمعده و سنگ کیسه صفرا استفاده می‌شود (Fintelmannz, 1999; Li et al., 2018). هم اکنون اداره دارو و غذای آلمان این گیاه دارویی را جهت اختلالات گوارشی، مسمومیت و سیروز کبدی و به‌عنوان یک مکمل دارویی در درمان التهاب کبدی پیشنهاد نموده است (Blumenthal and Busse 1998). به نظر می‌رسد فعالیت مواد مؤثره این گیاه در درمان بیماری-های کبد و جلوگیری از هپاتیت به‌خاطر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدان آن‌ها باشد، به‌طوری که از پراکسیداسیون چربی و تخریب غشای سلولی جلوگیری می‌نماید به‌علاوه بیوسنتز پروتئین را تحریک نموده و ترمیم سلول‌ها را در کبد صدمه دیده تسریع می‌نماید (Alikaridis et al., 2000). این گیاه اثرات با ارزشی در پیشگیری و درمان عوارض دراز مدت دیابت، نارسایی کلیوی و اختلالات سلول‌های عصبی دارد. وجود فلاونوئیدها در گیاه ماریتغال گزارش شده است (Divers & Barton, 2018) و سیلی‌بین مهم‌ترین فلاونوئید این گیاه است که در درمان سرطان پروستات نقش مؤثری را ایفا می‌نماید. این گیاه بیشتر به‌عنوان یک گیاه دارویی مطرح است، ولی استفاده-های دیگری برای آن مشخص شده است. از جمله آن که این گیاه قابلیت آن را دارد که به‌عنوان یک گیاه روغنی مطرح شود. همچنین از کنجاله آن در بعضی از کشورها در تغذیه دام‌ها استفاده می‌شود، استفاده از دانه این گیاه به‌میزان ۳۰۰ گرم در جیره روزانه گاوهای شیری در طی دو هفته باعث افزایش میزان شیر آن‌ها شده است (Wang & Kao, 1988). عصاره بذر این گیاه دارای ترکیبات بسیار زیادی از جمله سیلی‌بین A و B، سیلی‌دیانین، سیلی‌کریستین، آپی-ژنین، دی‌هیدروسیلیبین، دی‌اکسی‌سیلی‌کریستین، دی‌اکسی‌سیلی-دیانین و ... است. عصاره دانه خشک گیاه دارای یک الی چهار درصد، سیلی‌مارین است که شامل فلاونوئیدها از جمله سیلی‌بین A و B، سیلی دیانین، سیلی‌کریستین و دی هیدروسیلیبین است (Schandalik et al., 1992). دیگر فلاونولیگنان‌های موجود در عصاره این گیاه شامل سیلاندرین، سیلیبینوم، سیلی هرمین و اسیدهای میرستیک، پالمیتیک و استیریک می‌باشد که ممکن است خواص محافظت کبدی داشته باشند (Varma & Talwar, 1980). به‌علاوه ه خشک گیاه دارای ۱۵ الی ۲۰ درصد روغن می‌باشد که خواص دارویی ندارد (Schandalik et al., 1992). عصاره بذر این گیاه بعد از مصرف خوراکی حدود ۲۰ الی ۵۰ درصد جذب بدن می‌شود. اما کمپلکس فسفاتیدیل‌کولین (Phosphatidy choline) جذب بالاتری دارد (Salwa, 2011; Barzaghi et al., 1990).

مواد آلی عامل اصلی باروری خاک می‌باشند. مواد هیومیکی به‌عنوان بخشی از مواد آلی خاک‌های هوموسی می‌باشند که از تغییر شکل فیزیکی، شیمیایی و میکروبیولوژیکی و یا هومیفیکاسیون بیومولکول‌های موجود در خاک به‌وجود آمده‌اند، به‌طوری‌که ۸۰ درصد از ماده آلی خاک را تشکیل می‌دهند. در تعریف کلی، هوموس به مواد

تغییر شکل یافته حاصل از ارگانیسم‌های گیاهی و حیوانی گفته می‌شود، به عبارت دیگر، مواد هیومیکی از تغییر شکل ضایعات گیاهی و حیوانی در خاک و یا هوموس به‌دست می‌آیند (Stevenson, 1994). این مواد هر چند عمدتاً از بازمانده‌های گیاهی منشا می‌گیرند، ولی نه تنها از نظر ویژگی‌های ساختمانی بلکه به لحاظ کارکرد و نقش‌های مفید که در خاک ایفا می‌کنند هیچ گونه شباهتی به اجزای گیاهی ندارند و حاوی ترکیبات فنولیک، کربوهیدرات‌ها، آمینواسیدهای تغییر شکل یافته در یک ترکیب تجزیه شده هستند (O'Donnell, 1973). همچنین هیومیک اسید یک ترکیب پلیمری آلی است که در نتیجه پوسیدگی مواد آلی خاک، پیت، لیگنین و غیره به‌وجود می‌آید که می‌تواند جهت افزایش محصول و کیفیت آن به‌کار گرفته شود (Aiken, 1985). مواد هیومیکی ترکیبات پیچیده‌ای از هوموسی می‌باشند که دارای وزن ملکولی بالا و قدرت کمپلکس کنندگی زیاد می‌باشد (Mikkelsen, 2005).

در پژوهشی که توسط آپاراجیتا و همکاران (Das et al., 2012) روی گیاه دارویی حسن یوسف (*Coleus Forskohli*) انجام شد، تعامل قارچ *Piriformospora indica* با ریشه گیاه منجر به افزایش ارتفاع، تعداد شاخه، طول شاخه (بعد از شش ماه) شد. طی آزمایشی مشخص شد که تلقیح گیاه شبدر با قارچ‌های مایکوریزا موجب افزایش سطح برگ‌ها و در نتیجه، افزایش میزان کلروفیل آن‌ها شده و سرعت فتوسنتز خالص را در کل دوره رشد گیاه افزایش می‌دهد. قارچ‌های مایکوریزا به روش‌های مستقیم مانند بهبود تغذیه گیاه ماریتیغال از طریق افزایش جذب عناصر غذایی و همچنین جذب آب توسط گیاه (Smith et al., 1997) و غیرمستقیم مانند تنش‌های زیستی (بیماری‌های گیاهی) (Calvet et al., 1997) و غیرزیستی (شوری، خشکی، فلزات سنگین و غیره) (Rabie et al., 2005) سبب افزایش رشد گیاه میزبان می‌شوند. در پژوهشی که به‌منظور ارزیابی کاربرد ورمی‌کمپوست (صفر، ۵ و ۱۰ تن در هکتار) و هیومیک اسید (صفر، ۰/۵ و ۱ درصد) بر گیاه دارویی زنیان صورت گرفت، نتایج نشان داد، کاربرد توأم ورمی‌کمپوست و هیومیک اسید باعث افزایش تعداد چتر در بوته شد (Khalesro & Malekian, 2017). پژوهش‌های فراوانی در مورد کاربرد همزمان ورمی‌کمپوست و هیومیک اسید بر روی گیاهان دارویی صورت گرفته است (Hajghani et al., 2017; Saydi et al., 2017; Gholami et al., 2015).

با توجه به اهمیت گیاه ماریتیغال و نبود مطالعه کافی در مورد این گیاه، بررسی اثر نهاده‌های مغذی بر ویژگی‌های گیاه ماریتیغال بسیار ضروری است. همچنین استفاده بیش از حد از کودهای شیمیایی باعث آلودگی محیط زیست و به خطر افتادن سلامت انسان شده است. از این رو، هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر سه نوع ماده تأمین‌کننده عناصر غذایی آلی شامل هیومیک اسید، ورمی‌کمپوست و دو نوع قارچ مایکوریزا روی برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی (مانند پروتئین، قند، کلروفیل‌ها و کارتنوئید) و مورفولوژیکی (مانند عملکرد، سطح برگ، تعداد کاپیتول و غیره) گیاه ماریتیغال است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در شهرستان گرگان واقع در استان گلستان در سال ۱۳۹۸ انجام شده است. برای انجام این پژوهش بذر ماریتیغال از مرکز تحقیقات گیاهان دارویی اصفهان تهیه شدند. پس از آماده کردن بذرها، پتری دیش‌ها با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شدند. همچنین ابزار و ظروف مورد استفاده در این آزمایش، با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شدند. پس از اطمینان از پاکیزه بودن محیط و وسایل، کاغذ صافی را درون پتری دیش قرار داده و بذرها به‌ترتیب تیمارهای مورد نظر درون پتری دیش قرار گرفتند. بذرها پس از انتقال به گلدان و جوانه‌زنی، در مرحله دو تا چهار برگی تنک شدند. آبیاری با آب شهری هر سه روز یک‌بار انجام شد. سپس بذرها در فصل بهار به جعبه‌های کشت منتقل شدند. این پژوهش به‌صورت فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار به‌اجرا در آمد. تیمارهای مورد مطالعه در این پژوهش شامل چهار سطح ورمی‌کمپوست (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد (V0, V1, V2, V3))، هیومیک اسید (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر (H0, H1, H2, H3)) و دو گونه قارچ مایکوریزا *Glomus mosseae* و *Glomus intraradices* است. برای این تیمار بذرها را به‌صورت جداگانه به این دو گونه قارچ آغشته کرده، به‌صورت بذرمال مورد استفاده قرار گرفتند. برای تهیه ورمی‌کمپوست از پسماندهای آلی استفاده شد که بعد از خرد شدن در جعبه‌های مخصوص ریخته شده و رطوبت آن ها در حد ۶۰ درصد اشباع به‌مدت پنج هفته در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد. سپس به جعبه‌ها تعداد ۵۰ عدد کرم از گونه *Eisenia foetida* اضافه شد و هوادهی و رطوبت جعبه به‌صورت منظم در طول سه ماه بررسی شد. بعد از اعمال تیمارهای مورد نظر برداشت انجام شد و نمونه‌ها برای آنالیز شیمیایی به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

علمکرد، وزن هزار دانه و تعداد کاپیتول نیز اندازه‌گیری شدند. به‌منظور اندازه‌گیری سطح برگ در پایان آزمایش ابتدا برگ‌های هر گیاه جدا شده و سپس با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری سطح برگ و نرم‌افزار Windias 3 سطوح برگ‌ها به‌دست آمد. برای اندازه‌گیری مقدار کلروفیل a، b و کل و همچنین کارتنوئید ابتدا از هر نمونه تر گیاهی ۰/۵ گرم اندازه‌گیری شد. نمونه‌ها با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد در هاون ساییده تا خوب له شوند و بعد مجدداً ۱۰ میلی‌لیتر دیگر به آن استون ۸۰ درصد اضافه شدند تا در مجموع، هر نمونه به حجم ۲۰ میلی‌لیتر برسد. در مرحله بعد، لوله‌های آزمایش حاوی نمونه‌ها در سانتریفیوژ قرار گرفته و با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و نمونه‌ها به دو فاز مایع و جامد تقسیم شدند. در مرحله آخر دستگاه رفراکترومتر با استون ۸۰ درصد کالیبره شده، بعد مقداری از فاز مایع نمونه‌ها برداشت و در کوت ریخته شد و با دستگاه میزان جذب نوری آن در دو طول موج ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (T90, Beijing Scientific China Karaltay Instruments) قرائت شد. برای اندازه‌گیری هیدرات‌های کربن محلول از عصاره الکلی استفاده شد، برای این منظور ۰/۵ گرم ماده تر گیاهی را در پنج میلی‌لیتر الکل ۹۵ درصد خوب ساییده و محلول هموژن را جدا کرده، سپس پنج میلی-لیتر الکل ۷۰ درصد اضافه کرده و خوب ساییده و مجدد محلول هموژن را جدا کرده و برای بار دوم پنج میلی‌لیتر الکل ۷۰ درصد اضافه کرده و ساییده و بعد از جدا کردن محلول هموژن، این محلول را به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۳۵۰۰ دور سانتریفوژ شد. به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره الکلی سه میلی‌لیتر معرف آنترون (۱۵۰ میلی‌گرم آنترون +۱۰۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۷۲ درصد) اضافه شد و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش گرما داده شد و جذب این ماده در طول موج ۶۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (T90, Beijing Scientific China Karaltay Instruments) قرائت شد. منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف گلوکز (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر) رسم شد (Yemm & Willis, 1954). برای اندازه‌گیری پروتئین‌های محلول از روش ترکیب کردن عصاره گیاه و معرف برادفورد استفاده شد. برای تهیه عصاره، ۰/۱ گرم از بافت منجمد گیاهی با دو میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار با ۷ :pH خوب ساییده شد. همگنای حاصل در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۴۵ دقیقه و در دمای ۴°C سانتریفوژ شد. بخش رو شناور جدا و با ۲/۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد مخلوط و جذب محلول‌ها در ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (T90, Beijing Karaltay Scientific Instruments, China) در طول موج ۵۹۵ نانومتر میزان پروتئین محلول خوانده شد (Blumenthal and Busse 1998). در این پژوهش، تجزیه و تحلیل واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون دانکن در سطح پنج درصد انجام گرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس تیمارهای اعمال شده بر صفات مورفولوژیکی گیاه خارمریم

Table 1- Results of analysis of variance of treatments applied on morphological traits of *Silybum marianum*

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی d.f	میانگین مربعات M.S تعداد کاپیتول No of Capitule	سطح برگ Leaf area index	وزن هزار دانه 1000-grain weight	عملکرد Yield
تکرار Repetition	2	6.64^{ns}	5.45^{ns}	145.54*	4532.34^{ns}
تیمار Treatment	32	0.159**	3.73**	321.31**	4316.56**
تکرار × تیمار Treatment× Repetition	98	0.006**	0.12*	429.46**	8673.67**
خطا Error	65	0.20	0.131	76.53	3457.52
ضریب تغییرات CV	-	3.10	12.15	17.56	14.32

**، * و ns: به‌ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح یک و پنج درصد و عدم تفاوت معنی‌دار.

**, * and ns: significant at 1%, 5% probability levels and non- significant, respectively.

ادامه جدول ۱

Continue the table 1

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی d.f	میانگین مربعات M.S					
		پروتئین Protein	قند محلول Soluble sugars	کارتنوئید Carotenoids	کلروفیل کل Toal Chlorophyll	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل a Chlorophyll a
تکرار Repetition	2	0.342 ns	12.01 ns	2.041 ns	0.007 ns	32.54 ns	82.32 ns
تیمار Treatment	32	0.452**	17.13**	2.346**	0.025**	25.43**	24.54**
تکرار × تیمار Treatment× Repetition	98	0.126*	14.23**	0.022**	0.019**	49.69*	45.72*
خطا Error	65	0.104	5.09	0.051	0.007	21.34	45.65
ضریب تغییرات CV	-	0.42	0.20	11.06	9.34	0.002	0.002

**، * و ns: به‌ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح یک و پنج درصد و عدم تفاوت معنی‌دار.

**, * and ns: significant at 1%, 5% probability levels and non- significant, respectively

نتایج و بحث

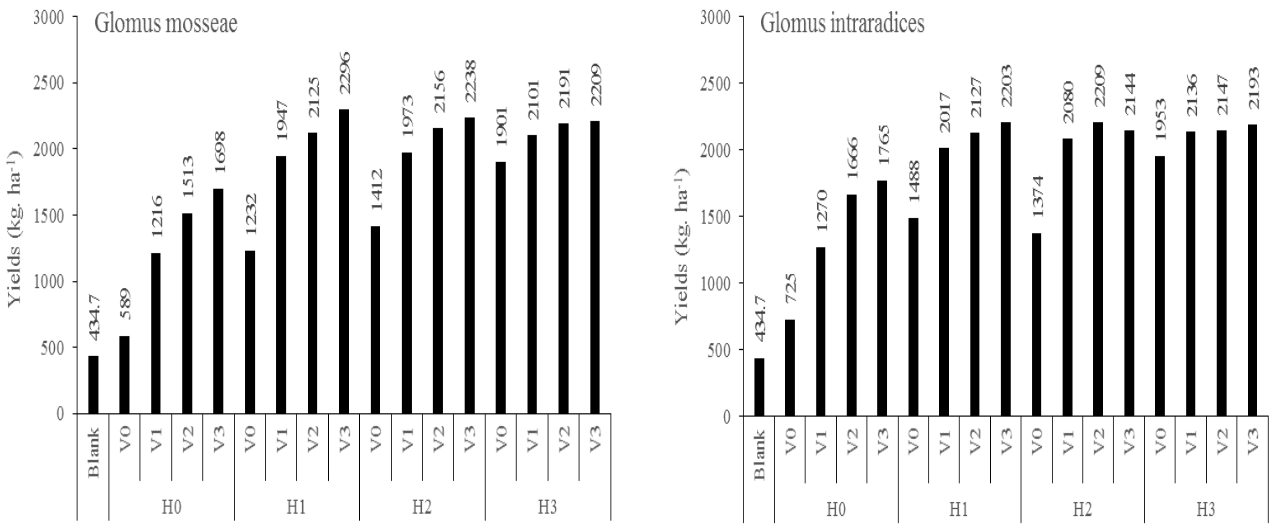
نتایج آنالیز واریانس اطلاعات نشان داده است که همه ویژگی‌های مورد بررسی تحت تأثیر اثر متقابل تیمارهای قارچ مایکوریزا، هیومیک اسید و ورمی‌کمپوست هستند.

عملکرد

در شکل ۱ نتایج تغییرات عملکرد دانه ناشی از اعمال تیمارها ارائه شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، بیشترین عملکرد در قارچ *Glomus mosseae* سطح سوم ورمی‌کمپوست و سطح اول هیومیک اسید معادل ۲۲۹۶ کیلوگرم در هکتار به‌دست آمده است. کمترین عملکرد نیز در شاهد (۴۳۵ کیلوگرم در هکتار) به‌دست آمده است. به‌طور کلی، نتایج نشان داده است که با افزایش هیومیک اسید و ورمی‌کمپوست، عملکرد گیاه افزایش چشمگیری داشته است. علت افزایش عملکرد را می‌توان به تأمین عناصر غذایی، تأمین آب و بهبود وضعیت تنفسی گیاه ناشی از مصرف کودهای آلی و زیستی نسبت داد. نتایج نشان داده است که استفاده از قارچ به دلایل مختلف سبب بهبود وضعیت گیاه شده است. یکی از این دلایل بهبود وضعیت جذب و قابلیت استفاده از آب توسط سیستم ریشه است. تأثیری که همزیستی مایکوریزی در اصطلاح توازن آبی گیاه میزبان دارد، ممکن است از طریق تأثیر هیف این قارچ‌ها در بهبود ساختمان خاک و افزایش توانایی نگهداری آب در خاک باشد. هنگامی که خاک اطراف ریشه به‌دلیل مصرف آب خشک می‌شود، علایمی از سمت ریشه به اندام هوایی ارسال می‌شود که منجر به بسته شدن روزنه‌ها می‌شود. در گیاهان مایکوریزا مشاهده شده است که این علایم کندتر منتقل شده و حتی در مواردی که قسمتی از ریشه مواجه با خاک خشک می‌باشد، روزنه‌ها هنوز باز بوده و فتوسنتز انجام می‌شود (Auge & Duan, 1991). از دیگر دلایل بهبود شرایط گیاه را می‌توان به کاهش اثرات مخرب بیمارگرها نسبت داد. مایکوریزاها باعث افزایش مقاومت میزبان‌های خود به انواعی از آفات و بیمارگرهای خاکزا می‌گردند مشابه استنباط صورت گرفته از روابط آبی، بخشی از مقاومت ایجاد شده در برابر عوامل بیماری‌زا، به‌دلیل جذب بیشتر عناصر معدنی در گیاهان مایکوریزی می‌باشد. افزایش جذب مقاومت در برابر آفات و بیماری‌ها را در پی داشته باشد (Graham et al., 1998). سایر اثرات متقابل ریشه بیمارگر گیاهی که توسط مایکوریز تحت تأثیر قرار می‌گیرد، به‌دلیل پیش کلونیزاسیون ریشه‌ها توسط این قارچ‌ها قبل از فعالیت بیمارگر می‌باشد (Afek et al., 1990; Sherameti et al., 2008).

در آزمایشی که توسط عزیزی و همکاران (Azizi et al., 2004) بر روی گیاه دارویی ریحان (*Ocimum basilicum*) صورت گرفت، مشاهده شد که تیمارهای حاوی ورمی‌کمپوست، به‌طور چشمگیری عملکرد را در مقایسه با شاهد افزایش دادند که نتایج این پژوهشگران با نتایج حاصل از این پژوهش تطابق دارد. عبداله زارع و همکاران

(Abdollahzare et al., 2011) نیز با استفاده از مصرف کودهای شیمیایی و آلی مقدار عملکرد ۲۱۷۵ کیلوگرم در هکتار را برای گیاه ماریتیغال به‌دست آوردند. شهروزوند و همکاران (Shahrusvand et al., 2020) نشان دادند که با افزایش مقدار ورمی‌کمپوست عملکرد گیاه سویا (*Glycine max*) افزایش معنی‌داری یافته است.



شکل ۱- اثر تیمارهای اعمال شده بر عملکرد گیاه خارمریم

Fig. 1- Effect of treatments on yield of *Silybum marianum*

ورمی‌کمپوست (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد (V_0, V_1, V_2, V_3))،

هیومیک اسید (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر (H_0, H_1, H_2, H_3))

Vermicompost (0, 25, 50 and 75 % (V_0, V_1, V_2, V_3))

Humic acid (0, 25, 50 and 75 mg L^{-1} (H_0, H_1, H_2, H_3))

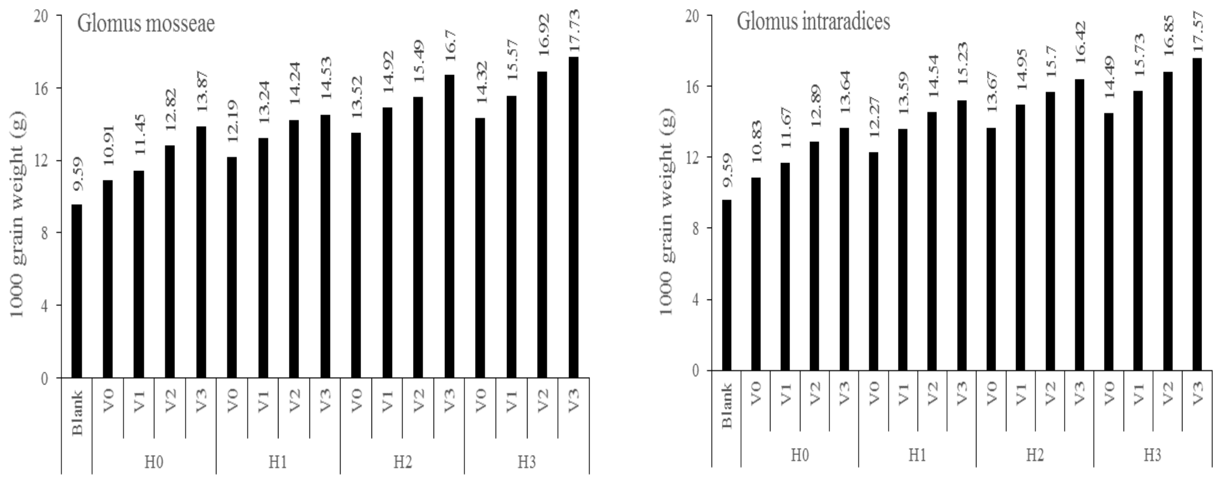
وزن هزار دانه

در شکل ۲ نتایج تغییرات وزن هزار دانه تحت تأثیر تیمارهای اعمال شده نمایش داده شده است. نتایج نشان داده است که با افزایش سطوح ترکیبات آلی وزن هزار دانه افزایش یافته است. بیشترین وزن هزار دانه در تیمار قارچ *Glomus mosseae* و سطح چهارم هیومیک اسید و ورمی‌کمپوست (۱۷/۷۳ گرم) به‌دست آمده است. اثرات مثبت ترکیبات هیومیکی در جذب مواد غذایی در توت فرنگی توسط پیلانلی و کاپلان (Pilanali & Kaplan, 2003)، اثر مثبت اسید هیومیک بر رشد و محصول نهایی گوجه‌فرنگی و خیار در کشت هیدروپونیک توسط آتیه و همکاران (Atiyeh et al., 2002) نشان داده شد. نتایج پژوهش اکبری‌نیا و همکاران (Akbarinia et al., 2003) بر روی گیاه زنیان (*Trachyspermum copticum*) حاکی از این است که در سیستم زیستی، با افزایش کود دامی، عملکرد دانه و عملکرد بیولوژیک به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر کود دامی افزایش یافت. قارچ‌های مایکوریزا به روش‌های مستقیم مانند بهبود تغذیه گیاه ماریتیغال از طریق افزایش جذب عناصر غذایی و همچنین جذب آب توسط گیاه (Smith et al., 1997) و غیرمستقیم مانند تنش‌های زیستی (بیماری‌های گیاهی) (Calvet et al., 1997) و غیرزیستی (شوری، خشکی، فلزات سنگین و غیره) (Rabie et al., 2005) سبب افزایش رشد گیاه میزبان می‌شوند.

سطح برگ

در شکل ۳، نتایج تغییرات سطح برگ در تیمارهای مختلف آمده است. مشاهده می‌شود که بالاترین مقدار سطح برگ در تیمار سطح چهارم هیومیک اسید و ورمی‌کمپوست در هر دو نوع قارچ به‌دست آمده است. در مورد سطح برگ نیز مشاهده می‌شود که همانند عملکرد و وزن هزار دانه یک روند افزایشی به‌دست آمده است. به این صورت که با افزایش سطح هیومیک اسید و ورمی‌کمپوست، مساحت سطح برگ افزایش یافته است. کمترین مساحت سطح برگ در شاهد برابر با ۱/۲۴ سانتی‌مترمربع به‌دست آمده است. اصلانی و همکاران (Aslani et al., 2011) گزارش کردند بیشترین سطح برگ بین دو رقم *Glomus mosseae* و *Glomus intraradices* در رقم

Glomus mosseae بـه‌دسـت آمـد کـه علـت ایـن امـر را درصـد کلونیزاسیون بیشتر این رقم گزارش کرد. طبق گزارش هاریس و پاول (Harris & Paul., 1987) هم‌زیستی با قـارچ مـایکوریزا مـی‌تواننـد فتوسنتز را از طریق تغییرات مورفولوژیکی از قبیل افزایش سطح برگ، افزایش دهند. شاخص سطح برگ و محتوی کلروفیـل در بـرگ‌هـای (*Pistacia vera* L.) و همچنین میزان فتوسنتز در تیمارهای ورمـی-کمپوست نسبت به تیمارهای بدون ورمی‌کمپوست بالاتر بود



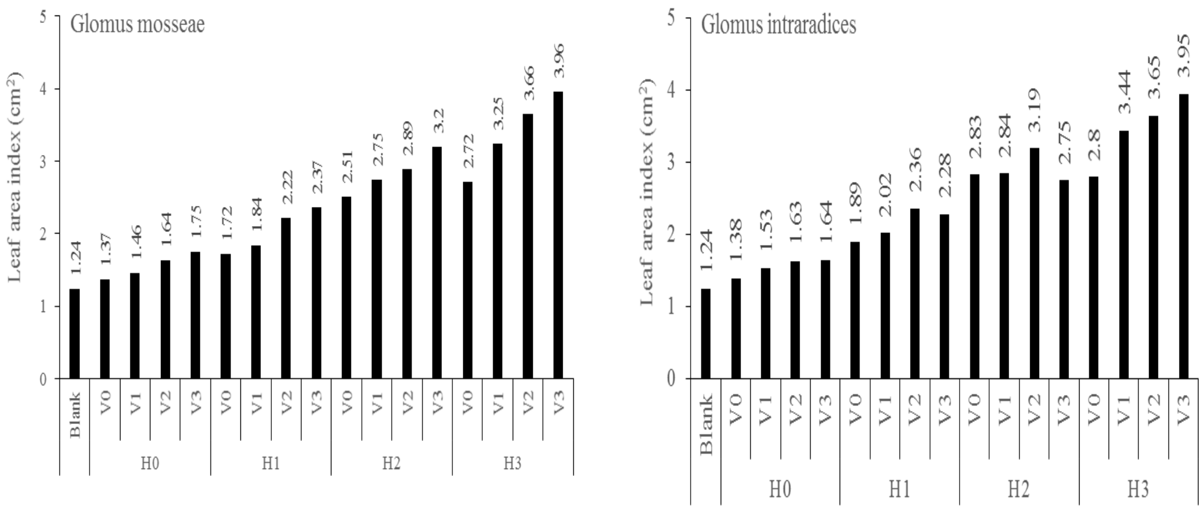
شکل ۲- اثر تیمارهای اعمال شده بر وزن هزار دانه گیاه خارمریم

Fig. 2- Effect of treatments on 1000-grain weight of *Silybum marianum*

ورمی‌کمپوست (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد (V_0, V_1, V_2, V_3))،

هیومیک اسید (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر (H_0, H_1, H_2, H_3))

Vermicompost (0, 25, 50 and 75 % (V_0, V_1, V_2, V_3))
Humic acid (0, 25, 50 and 75 mg L^{-1}(H_0, H_1, H_2, H_3))



شکل ۳- اثر تیمارهای اعمال شده بر سطح برگ گیاه خار مریم

Fig. 3- Effect of treatments on Leaf area index of *Silybum marianum*

ورمی‌کمپوست (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد (V_0, V_1, V_2, V_3))،

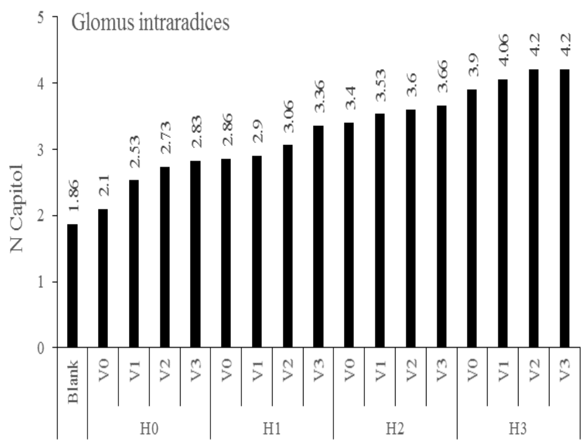
هیومیک اسید (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر (H_0, H_1, H_2, H_3))

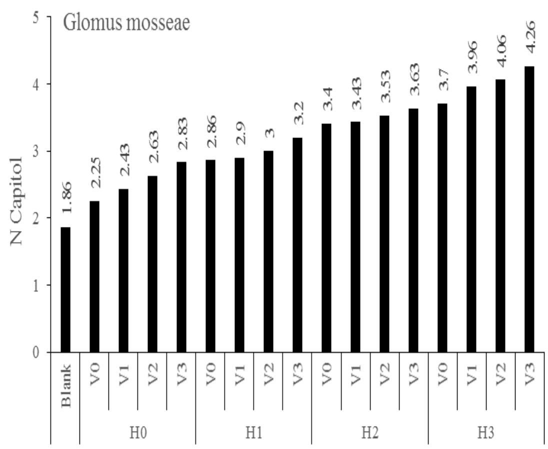
Vermicompost (0, 25, 50 and 75 % (V_0, V_1, V_2, V_3))
Humic acid (0, 25, 50 and 75 mg L^{-1}(H_0, H_1, H_2, H_3))

. در پژوهش آتیه و همکاران (Atiyeh et al., 2002) بیشترین سطح برگ و محتوی کلروفیل در ۱۰ و ۲۰ درصد ورمی‌کمپوست به‌دست آمد که با نتایج این پژوهش همسو می‌باشد. همچنین الکوبایسی و همکاران (Alkobaisy et al., 2020) نشان دادند که استفاده از مایکوریزا و ورمی‌کمپوست سبب بهبود سطح برگ در گیاه سویا شده است.

تعداد کاپیتول

در شکل ۴ نتایج تغییرات تعداد کاپیتول در بوته تحت تأثیر تیمارهای اعمال شده آمده است. در این صفت نیز همانند دیگر صفات یک روند افزایشی منظم در تعداد کاپیتول با افزایش مصرف ترکیبات آلی به‌دست آمده است، به نحوی که بیشترین تعداد در تیمار سطح چهارم هیومیک اسید و ورمی‌کمپوست در قارچ *Glomus mosseae* (۴/۳) و *Glomus intraradices* (۴/۲) به‌دست آمده است. افزایش رشد گیاهان با کاربرد مواد هیومیکی گاهی اوقات با افزایش در دسترس بودن عناصر میکرو خصوصاً آهن و روی ارتباط دارد. در بعضی موارد افزایش جذب عناصری مانند آهن و فسفر در حضور مواد هیومیک به کاهش سرعت رسوب آن‌ها در محیط خاک یا محلول غذایی توسط این مواد نسبت داده می‌شود (Mackowiak et al., 2001). تحقیقات نشان داده است که کاربرد اسید هیومیک بر روی محصولات مختلف سبب افزایش میزان محصول و بهبود کیفیت آن می‌گردد. در پژوهشی که در کشور مصر بر روی گیاه انگور (*Vitis vinifera*) صورت گرفت، نشان داده شده است که استفاده از هیومیک اسید سبب افزایش اندازه حبه‌های انگور و افزایش میزان مواد جامد محلول و کیفیت آن شده است (Eman et al., 2008). همچنین در پژوهشی دیگر که بر روی سیب زمینی (*Solanum tuberosum*) صورت گرفت، نشان داده شد که استفاده از هیومیک اسید و کودهای آلی از طریق محلول‌پاشی و کاربرد آن از طریق آبیاری قطره‌ای موجب افزایش کیفیت و کمیت غده‌های آن شده است (Selim et al., 2009). به‌علاوه هیومیک اسید دارای خواص ضدقارچی بوده و از این طریق نیز می‌تواند با کاهش آلودگی‌های قارچی و کنترل آن سبب افزایش کمّی و کیفی محصول در گیاهان گردد. در همین زمینه پژوهشی بر روی درخت نارنگی (*Citrus tangerina*) صورت گرفت که نشان داد استفاده از هیومیک اسید سبب کاهش بیماری پوسیدگی ریشه در اثر قارچ فایتوفترا (Phytophthora) شده و نیز سبب افزایش کیفیت و کمیت محصول در آن شده است (Mohamedy & Ahmed, 2009). هیومیک اسید، متابولیسم گیاهی را به‌طور فعالی تغییر می‌دهد و با فعال‌سازی مواد شبه هورمونی موجب تحریک رشد و نمو گیاه می‌گردد (Mikkelson, 2005).





شکل ٤- اثر تیمارهای اعمال شده بر تعداد کاپیتول گیاه خارمریم

Fig. 4- Effect of treatments on capitule of *Silybum marianum*

ورمی‌کمپوست (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد (V_0, V_1, V_2, V_3))،

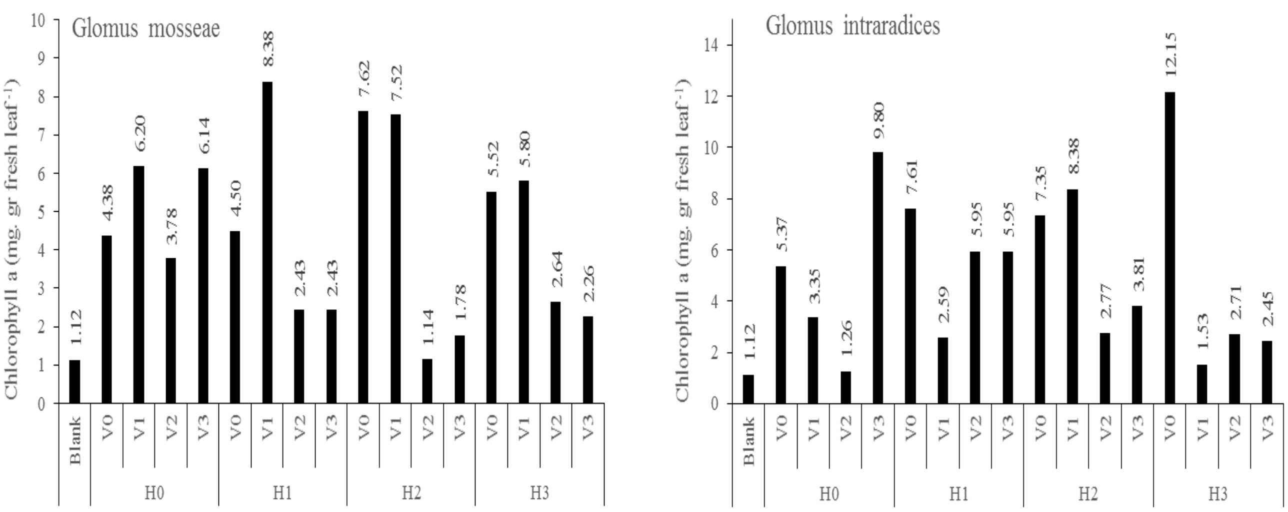
هیومیک اسید (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر (H_0, H_1, H_2, H_3))

Vermicompost (0, 25, 50 and 75 % (V_0, V_1, V_2, V_3))

Humic acid (0, 25, 50 and 75 mg L^{-1}(H_0, H_1, H_2, H_3))

کلروفیل a

تغییرات اثر تیمارهای اعمال شده در بستر کشت گیاه دارویی ماریتیغال بر کلروفیل a در گیاه (شکل ۵) نشان داد که بیشترین مقدار کلروفیل a در گیاه (۱۲/۱۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مربوط به هیومیک اسید $75\ g.l^{-1}$ + قارچ مایکوریزا *Glomus intraradices* و کمترین کلروفیل a در گیاه (۱/۱۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مربوط به شاهد بود. نتایج نشان داده است که در قارچ *Glomus mosseae* استفاده از سطح دوم ورمی‌کمپوست (۲۵ درصد) نسبت به سطوح بالاتر آن اثرات بهتری داشته است. همچنین مشاهده شده است که با افزایش هیومیک اسید به‌صورت کلی روند کلروفیل a افزایش نسبی یافته است. هیومیک اسید با افزایش جذب مواد غذایی و کاهش تبخیر و تعرق باعث افزایش فتوسنتز و در نهایت، سبب افزایش تولید رنگدانه‌های گیاهی می‌شود که از جمله کلروفیل‌های a، b، کل و کارتنوئید می‌گردد. در همین راستا، باسیونی و همکاران (Bassiouny et al., 2014) بیان داشت که تأثیر مثبت هیومیک اسید بر روی سوخت و ساز سلول‌های گیاهی سبب افزایش رنگدانه‌ها می‌شود و طبق گزارشات با مصرف هیومیک اسید در خاک سبب افزایش جذب منیزیم و آهن در گیاه می‌گردد. شهروزوند و همکاران (Shahrusvand et al., 2020) در مطالعه‌ای بر روی گیاه سویا نشان دادند که افزایش مقدار ورمی‌کمپوست سبب افزایش معنی‌دار میزان کلروفیل a شده است که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد.



شکل ۵- اثر تیمارهای اعمال شده بر مقدار کلروفیل a گیاه خارمریم

Fig. 5- Effect of treatments on chlorophyll a of *Silybum marianum*

ورمی‌کمپوست (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد (V_0, V_1, V_2, V_3))،

هیومیک اسید (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر (H_0, H_1, H_2, H_3))

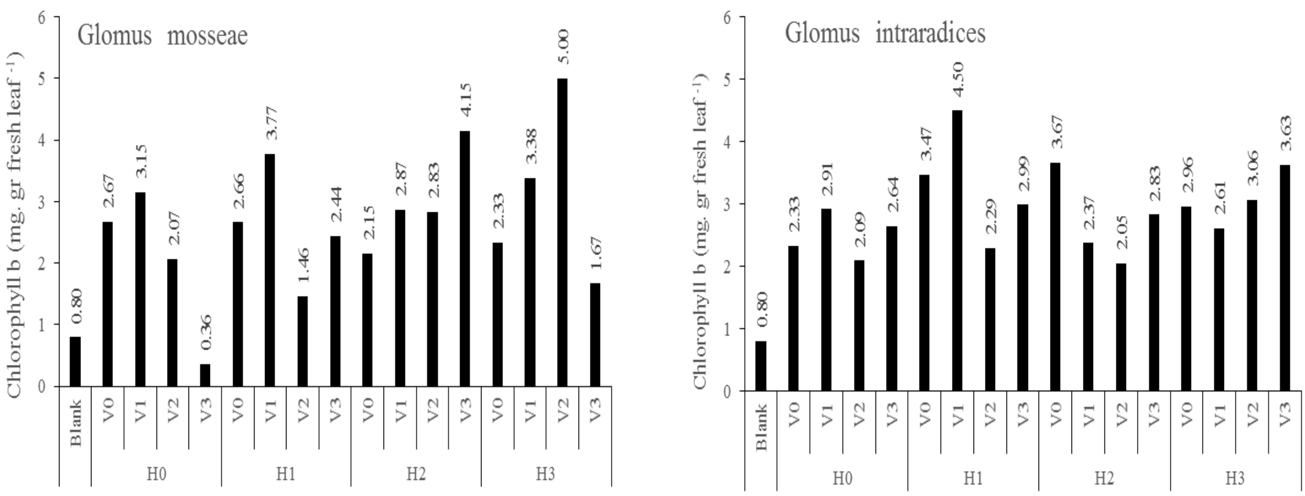
Vermicompost (0, 25, 50 and 75 % (V_0, V_1, V_2, V_3))

Humic acid (0, 25, 50 and 75 mg L^{-1}(H_0, H_1, H_2, H_3))

کلروفیل b

نتایج تغییرات تغییرات کلروفیل b در شکل ۶ نمایش داده شده است. تغییرات اثر تیمارهای اعمال شده در بستر کشت گیاه دارویی ماریتیغال بر کلروفیل b در گیاه (شکل ۲) نشان داد که بیشترین مقدار کلروفیل b در گیاه (۵/۰۰ میلی گرم بر گرم وزن تر) مربوط به هیومیک اسید $75\ g.l^{-1}$ + قارچ مایکوریزا *Glomus mosseae* و کمترین کلروفیل b در گیاه (۰/۳۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مربوط به سطح اول هیومیک اسید و قارچ مایکوریزا *Glomus mosseae* است. نتایج نشان داده است که استفاده از قارچ‌های مختلف تأثیرات متفاوتی بر روی مقدار کلروفیل گیاه دارد. چرا که هر قارچ با عملکرد ویژه خود تأثیرات متفاوتی بر تغذیه گیاه و دیگر شرایط رشد گیاه دارد. با توجه به نتایج، یک روند کلی در افزایش کلروفیل b با افزایش هیومیک اسید نشان داده شده است. مواد هیومیک توانایی ایجاد کمپلکس با انواع کاتیون‌ها را دارند و می‌توانند به‌عنوان منبع

ذخیره‌کننده برای کاتیون‌های چند ظرفیتی به‌کار روند (Mikkelsen, 2005). در مورد کلروفیل b نیز همانند کلروفیل a روند مشخصی در افزایش ورمی‌کمپوست مشاهده نشده است و در مقادیر کم ورمی‌کمپوست مقدار کلروفیل b بالاتری به‌دست آمده است. در تیمارهای اعمال شده به همراه قارچ *Glomus intraradices* روند مشخص‌تری در افزایش کلروفیل b به‌دست آمده است. به این صورت که با افزایش درصد ورمی‌کمپوست مصرفی، مقدار کلروفیل b افزایش یافته است. هیومیک اسید می‌تواند به‌عنوان یک بازدارنده و مانع‌شونده اوره از و همین‌طور بازدارنده نیتریفیکاسیون در بعضی شرایط عمل کند (Mikkelsen, 2005). شهروزوند و همکاران (Shahrusvand et al., 2020) نشان دادند که با تغییرات مقدار ورمی‌کمپوست مقدار کلروفیل b به‌صورت معنی‌داری تغییر می‌کند. نتایج این پژوهشگران با نتایج به‌دست آمده از این مطالعه در یک راستا است.



شکل ٦- اثر تیمارهای اعمال شده بر مقدار کلروفیل b گیاه خارمریم

Fig. 6- Effect of treatments on chlorophyll b of *Silybum marianum*

ورمی‌کمپوست (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد (V_0, V_1, V_2, V_3))،

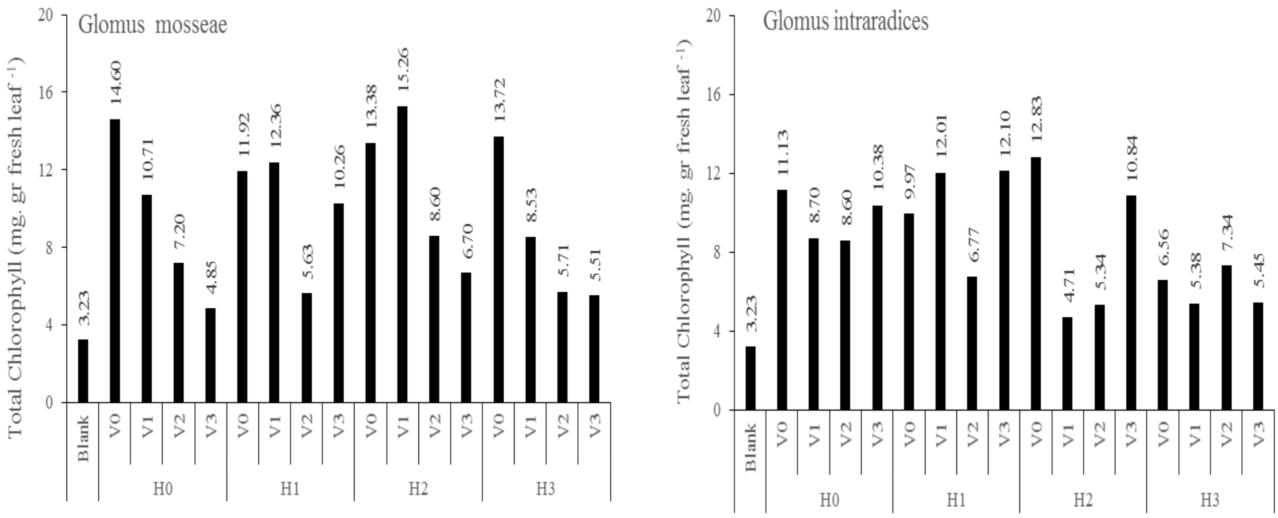
هیومیک اسید (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر (H_0, H_1, H_2, H_3))

Vermicompost (0, 25, 50 and 75 % (V_0, V_1, V_2, V_3))

Humic acid (0, 25, 50 and 75 mg L^{-1}(H_0, H_1, H_2, H_3))

کلروفیل کل

تغییرات اثر تیمارهای اعمال شده در بستر کشت گیاه دارویی ماریتیغال بر کلروفیل کل در گیاه (شکل ۷) نشان داد که بیشترین مقدار کلروفیل کل در گیاه (۱۵/۲۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مربوط به هیومیک اسید $g.l^{-1}$ ۵۰ + قارچ مایکوریزا *Glomus mosseae* در سطح ۲۵ درصد ورمی‌کمپوست به‌دست آمده است. کمترین مقدار کلروفیل کل در گیاه (۳/۲۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مربوط به شاهد بود. نتایج نشان داده است که به‌صورت کلی با افزایش هیومیک اسید میزان کلروفیل در گیاه افزایش یافته است. هیومیک اسید، نفوذپذیری غشاهای سلولی را افزایش داده و بدین طریق ورود پتاسیم را تسهیل می‌کند که نتیجه آن افزایش فشار داخل سلولی و تقسیم سلول است. از طرف دیگر، افزایش انرژی در داخل سلول منجر به افزایش تولید کلروفیل و میزان فتوسنتز خواهد شد (Giasuddin et al., 2007). پژوهش‌های زیادی نشان داده‌اند که استفاده از ریزجانداران در داخل خاک بر روی محتوی کلروفیل کل مؤثر است (Fatma et al., 2006; Han & Lee, 2005; Stefan et al., 2005).



شکل ۷- اثر تیمارهای اعمال شده بر مقدار کلروفیل کل گیاه خارمریم

Fig. 7- Effect of treatments on total chlorophyll of *Silybum marianum*

ورمی‌کمپوست (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد (V_0, V_1, V_2, V_3))،

هیومیک اسید (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر (H_0, H_1, H_2, H_3))

Vermicompost (0, 25, 50 and 75 % (V_0, V_1, V_2, V_3))

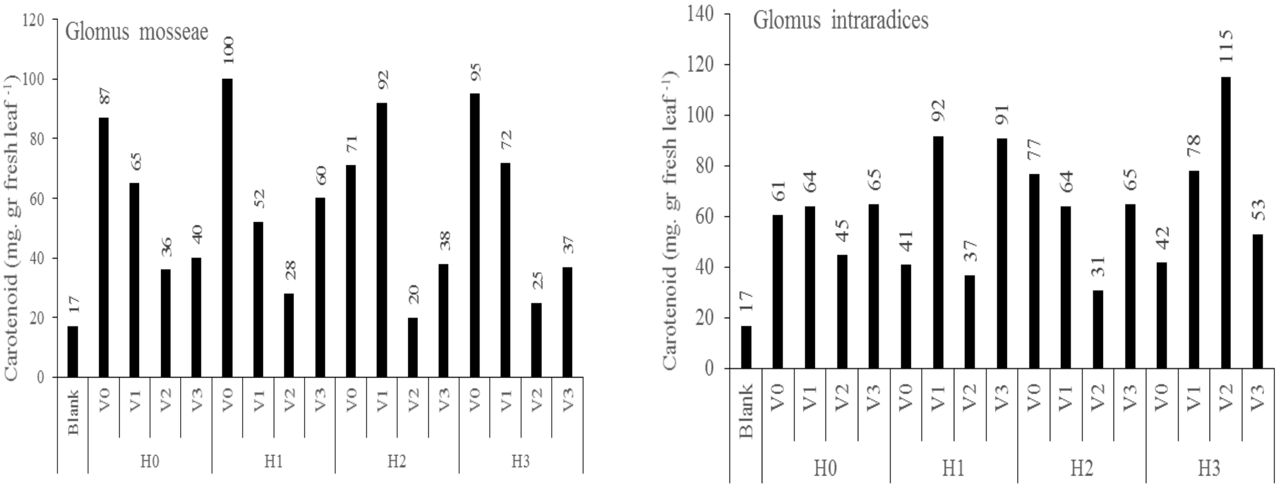
Humic acid (0, 25, 50 and 75 mg L^{-1}(H_0, H_1, H_2, H_3))

کارتنوئید

در شکل ۸ نتایج تغییرات تیمارهای اعمال شده بر مقدار کارتنوئید نشان داده شده است. تغییرات اثر تیمارهای اعمال شده نشان داد که بیشترین مقدار کارتنوئید در گیاه (۱۱۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مربوط به هیومیک اسید $mg.l^{-1}$ ۷۵ + قارچ مایکوریزا *Glomus intraradices* در سطح دوم ورمی‌کمپوست (۲۵ درصد) به‌دست آمده است. و همچنین کمترین کارتنوئید در گیاه (۱۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مربوط به شاهد بود. به‌طور کلی، نتایج نشان داده است که در قارچ *Glomus mosseae* با ورمی‌کمپوست نتایج مناسبی برای گیاه ارائه نمی‌دهد و در غالب موارد در این قارچ سطح ورمی‌کمپوست صفر دارای مقادیر بیشتری از کارتنوئید است. در مورد قارچ *Glomus intraradices* با افزایش سطح ورمی‌کمپوست مقدار کارتنوئید تغییر کرده و در برخی موارد افزایش یافته است. همچنین نتایج نشان داده است که افزایش مقدار مواد هیومیکی باعث افزایش نسبی کارتنوئید شده است. علت این موضوع این است که مواد هیومیکی حلالیت و قابلیت انحلال فسفر خاک را از طریق کمپلکس آهن و آلومینیم در خاک‌های اسیدی و کلسیم در خاک‌های آهکی افزایش می‌دهد (Mikkelson, 2005).

هیدرات‌های کربن محلول (قند محلول)

نتایج تغییرات مقدار قند محلول در شکل ۹ نمایش داده شده است. تغییرات اثر تیمارهای اعمال شده در بستر کشت گیاه دارویی ماریتیغال بر قند محلول در گیاه (شکل ۹) نشان داد که بیشترین مقدار قند محلول در گیاه (۱۸۹۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر دانه) مربوط به ورمی‌کمپوست سطح سوم + هیومیک اسید سطح اول+ قارچ مایکوریزا *Glomus mosseae* و کمترین قند محلول در گیاه (۶۰۰ میلی‌گرم درگرم وزن‌تر دانه) مربوط به شاهد بود. در قارچ *Glomus mosseae* افزایش هیومیک اسید از سطح صفر به سطح یک باعث افزایش قند در گیاه شده است. امّا با افزایش مقدار هیومیک از سطح دوم و سوم اثر منفی بر روی مقدار قند داشته است. استفاده به‌صورت محلول‌پاشی برگی هیومیک اسید، تأثیر مثبتی روی رشد بخش هوایی و تجمع آهن، بور و پتاسیم در گیاه زیتون (*Olea europaea*) دارد، در این حالت با کاهش میزان نشاسته میزان قندهای محلول افزایش یافته است (Fernandez et al., 1996). نرگسی علیپور و همکاران (Nargesi Alipour et al., 2016) بیان کردند که استفاده از کودهای آلی باعث افزایش قند محلول در گیاه شده است.



شکل ۸- اثر تیمارهای اعمال شده بر مقدار کارتنوئید گیاه خارمریم

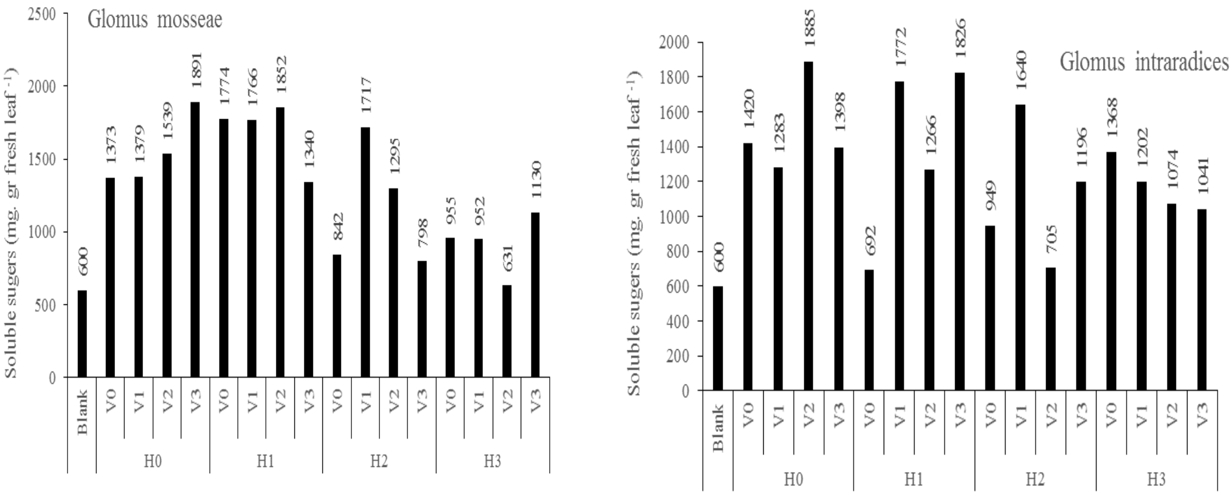
Fig. 8- Effect of treatments on carotenoids of *Silybum marianum*

ورمی‌کمپوست (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد (V_0, V_1, V_2, V_3))،

هیومیک اسید (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر (H_0, H_1, H_2, H_3))

Vermicompost (0, 25, 50 and 75 % (V_0, V_1, V_2, V_3))

Humic acid (0, 25, 50 and 75 mg L^{-1}(H_0, H_1, H_2, H_3))



شکل ۹- اثر تیمارهای اعمال شده بر مقدار قند محلول گیاه خارمریم

Fig. 9- Effect of treatments on soluble sugars of *Silybum marianum*

ورمی‌کمپوست (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد (V_0, V_1, V_2, V_3))،

هیومیک اسید (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر (H_0, H_1, H_2, H_3))

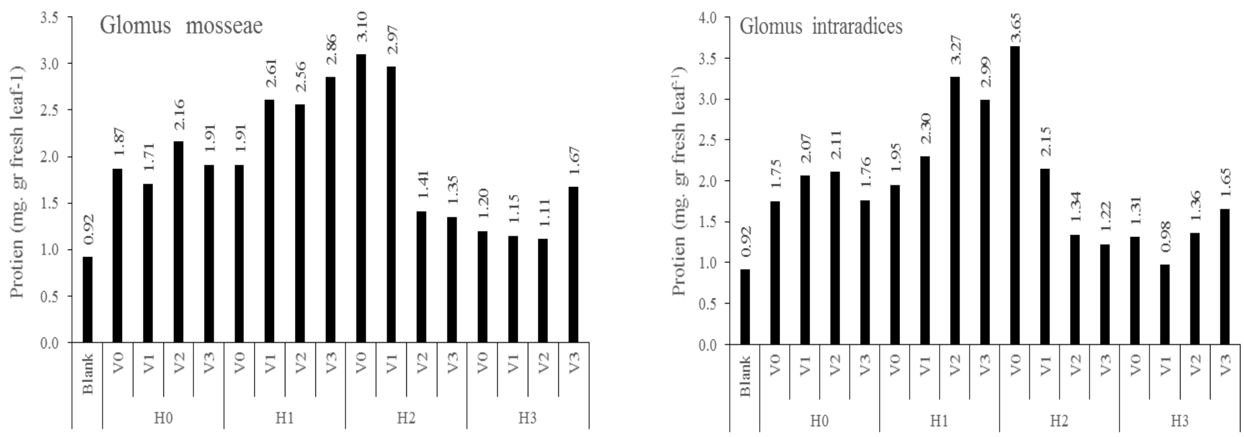
Vermicompost (0, 25, 50 and 75 % (V_0, V_1, V_2, V_3))

Humic acid (0, 25, 50 and 75 mg L^{-1}(H_0, H_1, H_2, H_3))

پروتئین

تغییرات اثر تیمارهای اعمال شده در بستر کشت گیاه داروئی ماریتیغال بر پروتئین بذر در گیاه (شکل ۱۰) نشان داد که بیشترین مقدار پروتئین در گیاه (۳/۶۵ میلی‌گرم در وزن تر) مربوط به سطح سوم هیومیک اسید و قارچ *Glomus intraradices* و کمترین پروتئین در گیاه (۰/۹۲ میلی‌گرم در وزن‌تر) مربوط به شاهد است. اسید هیومیک، سنتز حامل‌های پروتئین را در ریشه جو در مرحله پس از نسخه‌برداری افزایش می‌دهد (Dell Agnola et al., 1981). نتایج تغییرات نشان داده است که با افزایش مقدار هیومیک اسید از سطح صفر تا سطح دوم مقدار پروتئین افزایش یافته است، امّا در سطح سوم

کاربرد هیومیک اسید کاهش یافته است. اسید هیومیک با تولید بیشتر اسیدهای نوکلئیک و اسیدهای آمینه، تکثیر سلولی را در کل گیاه و به‌ویژه در ریشه‌ها افزایش می‌دهد (Dursun et al., 2002). نتایج این پژوهش با نتایج حاصل از مطالعه تأثیر همزیستی قارچ مایکوریزا بر خصوصیات فیزیولوژیک و مواد مؤثره سه رقم گیاه دارویی رازیانه (*Foeniculum vulgare*) نشان داد که نقش قارچ در افزایش تولید پروتئین است. قارچ مایکوریزا جذب نیتروژن که نقش کلیدی در ساختمان کلروفیل است را افزایش می‌دهد و از سوی دیگر، آن را مهم‌ترین عنصر در سنتز پروتئین و با افزایش قارچ مایکوریزا در شرایط مطلوب است منجر به افزایش مقدار پروتئین قابل توجهی است و همچنین در افزایش قند محلول مؤثر است (Barzegar Alvirdi et al., 2013) مطابقت دارد. امیری و همکاران (Amiri et al., 2017) نیز نشان دادند که کاربرد قارچ و هیومیک اسید سبب افزایش پروتئین در دانه گیاه گاوزبان (*Echium amoenum*) شده است. هیومیک اسید نیز از روش بهبود جذب عناصر غذایی و سهولت جذب عناصر ماکرو و میکرو منجر به افزایش درصد پروتئین دانه می‌شود (Eneji et al., 2013). در آزمایش‌های مزرعه‌ای روی کنجد (*Sesamum indicum*) نیز مشاهده شد که کاربرد هیومیک اسید به‌صورت محلول‌پاشی میزان پروتئین را افزایش داد (Salwa, 2011).



شکل ۱۰- اثر تیمارهای اعمال شده بر مقدار پروتئین گیاه خارمریم

Fig. 10- Effect of treatments on protein of *Silybum marianum*

ورمی‌کمپوست (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد (V_0, V_1, V_2, V_3))،

هیومیک اسید (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر (H_0, H_1, H_2, H_3))

Vermicompost (0, 25, 50 and 75 % (V_0, V_1, V_2, V_3))

Humic acid (0, 25, 50 and 75 mg L^{-1}(H_0, H_1, H_2, H_3))

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داده است که در تمامی صفات مورفولوژیکی که شامل سطح برگ، تعداد کاپیتول، وزن هزار دانه و عملکرد از میان این تیمارها، تیمار ورمی‌کمپوست ۷۵ درصد + هیومیک اسید ۷۵ $g.l^{-1}$ در هر دو نوع قارچ میکوریزا *Glomus intraradices* و *mossea* تأثیرگذاری بهتر و بیشتری نسبت به سایر تیمارها داشته و نمونه شاهد کمترین تأثیر را بر روی صفات مورد بررسی داشته شده است. بنابراین، بیشترین غلظت هیومیک اسید و ورمی‌کمپوست استفاده شده در این آزمایش و کاربرد این دو نوع قارچ میکوریزا بهترین نتایج را به همراه داشت. با توجه به نتایج حاصل از آزمایش‌ها و اندازه‌گیری‌های انجام شده در صفات فیزیولوژیکی که از بین آن‌ها صفت کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کارتنوئید، قند محلول و پروتئین تحت تأثیر غلظت‌های بالای هیومیک اسید و دو نوع قارچ مایکوریزا افزایش داشته است. همچنین نشان داده شد که غلظت‌های ورمی‌کمپوست کمترین تأثیر را نسبت به هیومیک اسید بر روی صفات فیزیولوژیکی را داشته است. کودهای آلی و زیستی به‌دلیل بهبود شرایط خاک (ساختمان و خاکدانه)، بهینه شدن مصرف آب، تأمین عناصر غذایی مورد نیاز گیاه و همچنین کاهش اثرات مخرب بیماری سبب افزایش

و بهبود صفات گیاه می‌شوند. قارچهای مورد مطالعه به‌دلیل افـزایش سطح ریشه تأثیر به‌سزایی در جذب آب و عناصر دارند. عناصـر مـورد نیاز گیاه در بخش‌های مختلف ماننـد کلروفیـل و پـروتئین‌هـا حضـور دارند، بنابراین، با افزایش جذب عناصر این اندام‌ها و ترکیبـات دارای وضعیت بهتری خواهند شد. در نهایت، نتایج حاصل از ایـن پـژوهش حاکی از آن است که کودهـای زیسـتی و آلـی و اسـتفاده از خاصـیت هم‌زیستی قارچهای مـایکوریزا بـر عملکـرد و اجـزای عملکـرد گیـاه ماریتیغال اثرات مثبت داشتند. این اثر مثبت را می‌توان به تأثیر بهبود-پذیری وضعیت فیزیکی و شیمیایی خاک توسط این مـواد و فراهمـی بهتر عناصر غذایی این گیاه نسبت داد، با توجه به اینکه آنچه در تولید گیاهان دارویی مد نظر است. افزایش زیست‌توده و تولید مـواد مـؤثره به‌صورت عاری از باقی مانده‌های سموم و کودهایی شیمیایی اسـت و به نظر می‌رسد، استفاده از تیمارهای به‌کار رفته در این پژوهش بتواند در جهت تولید سالم و پایدار گیاه داروئی ماریتیغال گام برداشت.

References

Abdollahzare, S., Fateh, E., and Aeineband, A., 2011. Investigation into different sowing dates and fertilization methods (chemical and organic) on yield and yield components of milk thistle (*Silybum marianum* L.). Journal of Plant Productions 35(1): 129-143. (In Persian with English Summary)

Afek, U., Menga, G.A., and Johnsen, E.L.V., 1990. Filecr of pythiutn ultimum and metalaxyl treatments on root length and mycorrhizal colonization of cotton, Onion and pepper. Plant Disease 74: 117-120. (In Persian with English Summary)

Aiken, G.R., Diane M.M., Wershaw, R., and MacCarthy, P., 1984. An Introduction to Humic Substances in Soil, Sediments, and Water. A Wiley-Interscience Publication. Chapter One. 1-9.

Akbarinia, A., Ghalavand, A., Sefidcon, F., Rezaee, M.B., and Sharifi, A., 2003. Study on the effect of different rates of chemical fertilizer, manure, and mixture of them on seed yield and main, compositions of essential oil of ajowan (*Trachyspermum copticum*). Pajouhesh and Sazandegi 61: 32-41. (In Persian with English Summary)

Alikaridis, F., Papadakis, D., Pantelia, K., and Kephalas, T., 2000. Flavonolignan production from *Silybum marianum* transformed and untransformed root Cultures. Fitoterapia 71:379-384. DOI: 10.1016/s0367-326x(00)00134-9.

Amiri, M.B., Rezvani Moghaddam, P., and Jahan, M., 2017. Effects of organic acids, mycorrhiza and rhizobacteria on yield and some phytochemical characteristics in low-input cropping system. Journal of Agricultural Science and Sustainable Production 27(1): 45-61. (In Persian with English Summary)

Aronon, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphennoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology 24(1): 1-150. DOI: org/10.1104/pp.24.1.1

Aslani, Z., Hassani, A., Rasooli Sadaghiyani, M., Sefidkon, F., and Barin, M., 2011. Effect of two fungi species of arbuscular mycorrhizal (*Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*) on growth, chlorophyll contents and P concentration in Basil (*Ocimum basilicum* L.) under drought stress conditions. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 27(3): 471-486. (In Persian with English Summary). DOI: 10.22092/IJMAPR.2011.6388.

Atiyeh, R., Lee, S., Edwards, C., Arancon, Q., and Metzger, J., 2002. The influence of humic acids derived from earthworm processed organic wastes on plant growth. Bioresour. Technology 84(1): 7–14. DOI: org/10.1016/S0960-8524(02)00017-2

Auge, R.M., and Duan, X., 1991. Mycorrhizal fungi and non hydraulic root signals of soil drying plant physiology. Environmental and Stress Physiology 97: 821-82. DOI: 10.1104/pp.97.2.821

Azizi, M., Lakzian, A., and Baghani, M., 2004. Investigation of the effect of different amounts of vermicompost on growth indices and amount of modified basil essential oil. Proceedings of the Second Conference on Medicinal Plants, Shahed University, Iran. February, 8-27: 62. (In Persian with English Summary)

Barzaghi, N., Crema, F., Gatti, G., Pifferi, G., and Perucca, E., 1990. Pharmacokinetic studies on IdB 1016, a silybin-phosphatidyl choline complex, in healthy human subjects. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics 15: 333-8. DOI: 10.1007/BF03190223

Barzegar Alvirdi, M., Afshari, H., Borhan, N., and Lai Ghanbar Zadeh, B., 2013. Effect of planting date and symbiosis of mycorrhizal fungi on physiological characteristics and effective substances of three Iranian fennel (*Foenicumlum vulgare* Mill) cultivars. Eco-Phytochemical Journal of Medicinal Plants 1(2): 64-75. (In Persian with English Summary)

Benda, L., Dittrich. H., Ferenzi, P., Frank, H., and Wewalk, F., 1980. The influence of therapy with *Silybum* on the

survival rate of patients with liver cirrhosis. Wien Klin Wochenschr 92: 678-83.

Blumenthal, E., and Busse, W., 1998. Monographs: Therapeutic guide to herbal medicines. Austin: American Botanical Council.

Calvet, C., Pinochet, J., Hernandez–Dorrego, A., Estaun, V., and Camprubi, A., 2001. Field micro plot performance of the Peach almond hybrid GF – 677 after inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi in a replant soil infested with root K not nematodes. Mycorrhizal 10: 295–300. DOI: org/10.1007/PL00009998

Das, A., Kamal. S., Akhtar Shakil, N., Sheramcti, I., Oelmuller, R., Dua, M. Tureja, N., Kumar, A., and Varma, A., 2012. The root endophyte fungus *Piriformospora indica* leads to early flowering, higher biomass and altered secondary metabolites of the medicinal plant. Coleus forskohlii, Plant Signaling and Behavior 7(1):103– 112. DOI: 10.4161/psb.7.1.18472

Dell Agnola, G., and Nardi, S., 1987. Hormone like effect of enhanced nitrate uptake induced by depolycondensed humic fractions obtained from *Allolobopbora rosea* and *A. caliginosa* facces. Biology and Fertility of Soils 4: 115-118.

Dursun, A., Guvenc, I., and Turan, M., 2002. Effects of different levels of humic acid on seedling growth and macro and micronutrient contents of tomato and eggplant. Acta Agrobotanica 56: 81-88. DOI: 10.5586/aa.2002.046

El-Bassiouny, H.S.M., Bakry, A.B., Abd El-Monem Attia, A., and Abd Allah, M.M., 2014. Physiological role of humic acid and nicotinamide on improving plant growth, yield, and mineral nutrient of wheat (*Triticum durum*) grown under newly reclaimed sandy soil. Agricultural Sciences 5: 687-700. DOI: 10.4236/as.2014.58072.

Eman, A.A., El-Monem, A.B.D., Saleh, M.S., and Mostafa, E.A., 2008. Minimizing the quantity of mineral nitrogen fertilizers on grapevine by using humic acid, organic and biofertilizers. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 4(1): 46-50.

EneJi, A.E., An, R., Islam, P., and Amalu, U.C., 2013. Nitrate retention and physiological adjustment of maize to soil amendment with superabsorbent polymers. Cleaner Production 18: 1-7. DOI: org/10.1016/j.jclepro.2013.02.027

Fatma, E.M., El-zamik, I., Tomader, T., ElHadidy, H.I., Abd El-Fattah, L., and Seham Salem, H., 2006. Efficiency of biofertilizers organic and in organic amendments on growth and essential oil of marjoram (*Majorana Hortensis*) plant growth in sandy and calcareous. Agriculture Microbiology Department, Faculty of Agriculture, Zayazig University and Soil Fertility and Microbiology Department, Desert Research Center Cairo Egypt.

Fayyaz, M., Zare, S., and Ashori, P., 2011. Identification and distribution of pharmaceutical and industrial crops of Chaharmahal-va-Bakhtiari province, Institute of Forests and Rangelands Research. (In Persian with English Summary)

Fernandez, R.I., Benloch, M., Bartanco, D., Duenas, A., and Ganan, J.A.G., 1996. Response of olive trees to foliar application of humic substance extracted from leonardite. Scientia Horticulturae 66(9): 200. DOI: org/10.1016/S0304-4238(96)00914-4

Fintelmannz, M., 1999. Phytotherapy and its uses in gastrointestinal condititions. Medicinal Plants 57: 48-52.

Gholami, A., Akbari, I., and Abbas Dokht, H., 2015. Study the effects of bio and organic fertilizers on growth characteristics and yield of fennel (*Foeniculum vulgar*). Journal of Agroecology 7(2): 215-224. (In Persian with English Summary)

Graham, J.H., and Egel, D.S., 1988. Phytophthora root development on mycorrhizal and phosphorus fertilized nonmycorrhizal sweet orange seedlings. Plant Disease 72: 614. DOI: 10.1094/PD-72-0611.

Greenlee, H., Abascal, K., Yarnell, E., and Ladas, E., 2007. Clinical Applications of *Silybum marianum* in Oncology. Integrative Cancer Therapies 6(2): 158-165. DOI: 10.1177/1534735407301727

Hajghani, M., Ghalavand, A., and Modarres Sanavy, S.A.M., 2017. Evaluation of yield, yield components and growth indices of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) in conventional and organic farming systems. Journal of Agroecology 9(1): 15-30. (In Persian with English Summary)

Han, H.S., and Lee, K.D., 2005. Plant growth promoting rhizobacteria effect on antioxidant status, photosynthesis, mineral uptake and growth of lettuce under soil salinity. Agricultural and Biological Sciences 6: 155- 180.

Harris, D., and Paul, E.A., 1987. Carbon Requirements of Vesicular– Arbuscular, Mycorrhizae, 93–103. In: Safir, G.E. (Ed.). Ecophysiology of VA Mycorrhiza Plants. CRC press, Boca Raton, USA, 224 p.

Kanel, S., and Choi, H., 2007. Adsorption of humic acid onto nanoscale zerovalent iron and its effect on arsenic removal. Environment Science Technology 41(6): 2022–2027. DOI: org/10.1021/es0616534

Khalesro, S., and Malekian, M., 2017. Effects of vermicompost and humic acid on morphological traits, yield, essential

oil content and component in organic farming of ajwan (*Trachyspermum ammi* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 32(6): 968-980. (In Persian with English Summary)

Luper, S., 1998. A review of plant used in the treatment of liver disease: Part 1. Alternative Medicine Review 3: 410-421.

Mackowiak, C.L., Grossl, P.R., and Bugbee, B.G., 2001. Beneficial effects of humic acid on micronutrient availability on Wheat. Soil Science 65: 1744–1750. DOI: .org/10.2136/sssaj2001.1744

Stefan, M., Ailiesei, O., Ungureanu, E., Dunca, S., Nimitan, E., & Artenie, V., 2005. Study of a microbial inoculation on several biochemical indices in sunflower (*Helianthus anuus* L.). Genetics and Molecular Biology 11-14.

Mikkelsen, R.I., 2005. Humic materials for agriculture. Better Crops 89(3): 6-8.

Mohamedi, R.S.R., and Ahmed. M.A., 2009. Effect of biofertilizers and humic acid on control of dry root rot disease and improvement yield quality of mandarin (*Citrus reticulate* Blanco). Journal of Agricuture and Biological Sciences 5(2): 127–137. (In Persian with English Summary)

Nargesi Alipour, N., Akhzari, D., and Fatahi, B., 2016. Investigation of the interaction of different levels of zeolite and compost on some soil properties and soil performance. Conservation of Plant Ecosystems 4(9): 151-164. (In Persian with English Summary)

O'Donnell, R.W., 1973. The auxin-like effects of humic preparation from leonardite. Soil Science 116: 106–112. DOI: org/10.1097/00010694-197308000-00007

Omid Beigi, R., 1997. Ways of Production and Processing of Medicinal Plants. Volume II. Publishers Designers Publishing. (In Persian)

Omid Beigi, R., 1998. Investigation of silymarin production and intermittent silage in wild plant cultivation with wild and agronomic seeds. Iranian Journal of Agricultural Sciences 29(2): 413. (In Persian with English Summary)

Pilanali, N., and Kaplan, M., 2003. Investigation on the effect on nutrient uptake of humic acid application of different forms to strawberry plant. Journal of Plant Nutrition 26(4): 835-843. DOI: org/10.1081/PLN-120018568

Rabie, G.H., 2005. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and kinetin on the response of mungbean plants to irrigation with seawater. Mycorrhiza 15: 225–230. DOI: 10.1007/s00572-004-0345-y.

Ram, G., Bhan, K.M., Gupta, K.K., Thaker Brijesh, U., and Pal, S., 2005. Variability pattern and correlation studies in *Silybum marianum* Gaertn. Fitoterapia 76: 147-143. DOI: 10.1016/j.fitote.2004.10.006

Salwa, A., 2011. Effect of amendments humic and amino acids on increases soils fertility yields and seeds quality of peanut and sesame on sandy soils. Agriculture and Biological Science 7(1): 115-125.

Saydi, Z., Fateh, E., and Aynehband, A., 2017. Effect of different sources of nitrogen and organic fertilizers on yield and yield components of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.). Journal of Agroecology 9(1): 115-128. (In Persian with English Summary)

Schandalik, R., Gatti, G., and Perucca, E.P., 1992. Pharmacokinetics of silybin in bile following administration of silipide and silymarin in cholecystectomy patients. Arzneimittelforschung 42: 964-8.

Selim, E.M., Mosa, A.A., and El Ghamry, A.M., 2009. Evaluation of humic substances fertigation through surface and subsurface drip irrigation systems on potato grown under Egyptian sandy soil conditions. Agricultural Water Management 96: 1218–1222. DOI:org/10.1016/j.agwat.2009.03.018

Sherameti, I., Tripathi, S., Varma, A., and Oclmuller, R., 2008. The root colonizing endophyte *Pirifomospora indica* confers drought tolerance in Arabidopsis by stimulating the expression of drought stress related genes in leaves. Mol Plant MicrobInteract 21: 799–807. (In Persian with English Summary)

Smith, S.E., and Read, G.J., 1997. Mycorrhizal Symbiosis. Academic press, San Diego California, pp.126–60.

Stevenson, F.J., 1994. Humus Chemistry. Genesis, Composition, Reactions. 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York. 1-96.

Varma, P.N., and Talwar, S.K., 1980. Chemical Investigations of *Silybum marianum*. Planta Med 38: 377.

Wang, H.C., and Kao, K.N., 1988. G-banding in plant chromosomes. Genome 30: 48-51.

Yemm, E., and Willis, A.J., 1954. The estimation of carbohydrate in plant extracts by Anthrone. Biochemical Journal 57: 508-514. DOI: 10.1042/bj0570508

Zargari, A., 1996. Medicinal Plants. Fifth Edition. Institute of Publishing and Printing, Tehran University Publishing, Tehran 136. (In Persian)